

## 大豆イソフラボンのマイクロRNA発現調節作用

立花宏文\*<sup>1</sup>・山下修矢<sup>2</sup>・林 宜蓓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食糧化学分野

<sup>2</sup>農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門

## Regulatory Action of Soy Isoflavone on MicroRNA Expression

Hirofumi TACHIBANA\*<sup>1</sup>, Shuya YAMASHITA<sup>2</sup> and I-Chian Lin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology,  
Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

<sup>2</sup>Institute of Fruit Tree and Tea Science, National Agriculture and Food Research  
Organization (NARO), Kagoshima 898-0087

### ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs), the small RNAs that have function to regulate gene expression, have recently attracted attention as molecules that relate to homeostasis and diseases. The relationship between the physiological effects of food factors and miRNAs have been mostly unknown. In the present study, we investigated the effect of soy isoflavones on miRNA expression and its mechanism. Oral intake of daidzein changed several serum-miRNAs expressions in mice. Daidzein also changed some serum-miRNAs expressions that other phytochemicals did not affect. In human cervical cancer cell line HeLa, miR-320a was identified as in miRNA whose expression level was up-regulated by isoflavone treatment. Isoflavone also decreased the protein expression of  $\beta$ -catenin encoded by CTNNB1, which is a target gene of miR-320a. So far, we have identified pap=associated domain containing 5 (Papd5) as the critical gene for cell growth-inhibitory action of isoflavones that are estrogen receptor-independent. Gene silencing of Papd5 canceled the miR-320a-increasing effect of equol. These results suggest that soy isoflavones increase miR-320a expression and suppress translation of miR-320a's target gene in the Papd5-dependent manner. *Soy Protein Research, Japan* **20**, 68-71, 2017.

Key words : isoflavone, microRNA, anticancer effect, Papd5.

\*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

大豆イソフラボンはエストロゲン受容体 (ER) に対して結合活性を有し<sup>1)</sup>、植物エストロゲン活性により骨粗鬆症の改善やがん予防など様々な保健作用が期待されている<sup>2)</sup>。他方、抗アレルギー作用<sup>3)</sup>や免疫系への影響<sup>4)</sup>など、ERを介さない作用も報告されており、我々はこれまでに、ダイゼインの腸内代謝産物であるエクオールのER非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う分子としてPap associated domain containing 5 (Papd5) を同定した。一方、低分子RNAの一種であるマイクロRNAは遺伝子の発現を制御する働きを持ち、様々な生命現象において重要な役割を持つ分子として注目されている。食品機能性研究分野においても、食品因子の生体調節作用とマイクロRNAの関係の解明は新たな知見をもたらすことが期待される。本研究では、マイクロRNA発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響について検討し、そのメカニズムの解明を目的とした。

## 方 法

### 細胞培養と試薬

ヒト子宮頸がん細胞株HeLaは10%牛胎児血清 (FBS) を含むDMEM培地により、37℃、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。エクオールはLC Laboratoriesより、ダイゼインは東京化成工業より購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。ヒト版マイクロRNA解析用チップは三菱レイヨンより購入した。マイクロRNA特異的プライマーはExiqon社より、Scramble-shRNA発現ベクター、Papd5-shRNA発現ベクターおよびCTNNB1特異的siRNAはSigma-Aldrichより購入した。

### HeLa細胞のマイクロRNA発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響の検討

HeLa細胞を播種し24時間前培養後、終濃度10  $\mu$ Mのダイゼインあるいはエクオールで24時間処理した。細胞より短鎖RNAを単離し、蛍光試薬により標識後、ヒト版マイクロRNA解析用チップを用いた解析に供した。

また、終濃度10  $\mu$ Mのダイゼインあるいはエクオールで処理したHeLa細胞よりトータルRNAを単離し、cDNAを合成後、miR-320a特異的なプライマーセットを用いたリアルタイムPCRに供した。内部標準としてU6を測定した。

### HeLa細胞の細胞増殖における $\beta$ -cateninの関与の検討

HeLa細胞に  $\beta$ -cateninをコードするmRNAであるCTNNB1に対して特異的なsiRNAをリポフェクション法により導入した。細胞を再播種し、96時間培養後の細胞数を計測した。

### 大豆イソフラボンのマイクロRNA発現調節作用におけるPapd5の関与の検討

RNA干渉法によりPapd5発現を低下させたHeLa細胞を播種し、24時間前培養後、終濃度10  $\mu$ Mのエクオールで24時間処理した。細胞よりトータルRNAを単離し、cDNAを合成後、miR-320a特異的なプライマーセットを用いたリアルタイムPCRに供した。内部標準としてU6を測定した。

## 結果と考察

### HeLa細胞のマイクロRNA発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響

マイクロRNA解析用チップを用いヒト子宮頸がん細胞株HeLaのマイクロRNA発現に及ぼすダイゼインおよびエクオールの影響について検討した結果、検出された83種類のマイクロRNAのうち、ダイゼイン処理により2種類、エクオールにより2種類のマイクロRNAの発現量がコントロール群の1.5倍以上増加した。一方、ダイゼインおよびエクオール処理により、発現量がコントロール群の3分の2以下に低下するマイクロRNAはなかった。ダイゼインおよびエクオールともに発現量の増加が認められたmiR-320aに着目し、その発現に及ぼすダイゼインおよびエクオールの影響についてリアルタイムPCR法により検証したところ、ダイゼインおよびエクオールはともにmiR-320aの発現量を増加させた (Fig. 1)。

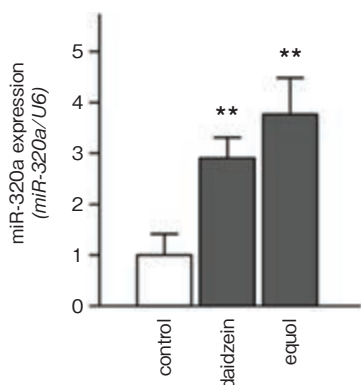


Fig. 1. Daidzein and equol increased miR-320a expression. The wild type HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M daidzein or equol for 24 h and then miR-320a expression levels were assessed by real-time quantitative PCR analysis. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . \*\* $p<0.01$ . "n.s." means not significant.

#### $\beta$ -cateninの発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響

$\beta$ -cateninはWnt経路において重要な役割を担うがん原たん白質であり、細胞増殖やアポトーシスを制御することでがんの発生や進行に関与している<sup>5)</sup>。 $\beta$ -cateninをコードするCTNNB1遺伝子のmRNA3'末端非翻訳領域にはmiR-320aと相補的な配列が存在し、miR-320aの標的遺伝子となりうることが報告されている<sup>6)</sup>。HeLa細胞において $\beta$ -cateninを一過性でノックダウンすると細胞増殖が著しく阻害されたことから、HeLa細胞の増殖において $\beta$ -cateninが重要であることが示された (Fig. 2)。HeLa細胞の $\beta$ -catenin発現に及ぼすダイゼインおよびエクオールの影響について検討したところ、これらのイソフラボンは $\beta$ -cateninの発現量を低下させたことから、大豆イソフラボンはmiR-320aの発現増加により $\beta$ -cateninの発現を抑制する可能性が示された (Fig. 3)。

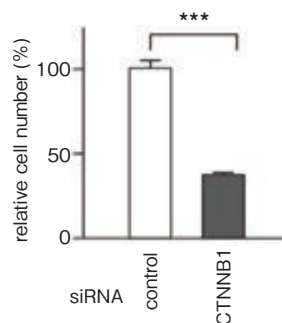


Fig. 2. Gene silencing of  $\beta$ -catenin inhibited cell proliferation in HeLa cells. After introduction of siRNA for CTNNB1 that encodes  $\beta$ -catenin into HeLa cells, the cells were cultured for 96 h and cell number was counted. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . \*\*\* $p<0.001$  "n.s." means not significant.

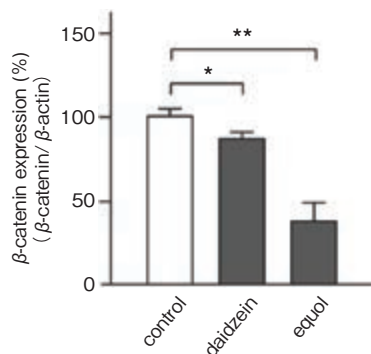


Fig. 3. Daidzein and equol decreased  $\beta$ -catenin expression. HeLa cells were treated with 10  $\mu$ M daidzein or equol for 72 h and then  $\beta$ -catenin protein expression levels were assessed by western blotting analysis. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

#### 大豆イソフラボンのマイクロRNA発現調節作用におけるPapd5の関与

HeLa細胞においてPapd5発現を低下させると、エクオールによるmiR-320aの発現増加は認められなかった。したがって、大豆イソフラボンのmiR-320a発現増加作用にはPapd5が関与することが示された。以上の結果より、エクオールはPapd5を介してmiR-320a発現を増加させ $\beta$ -catenin発現を抑制することでがん細胞増殖抑制作用を発揮する可能性が示された。

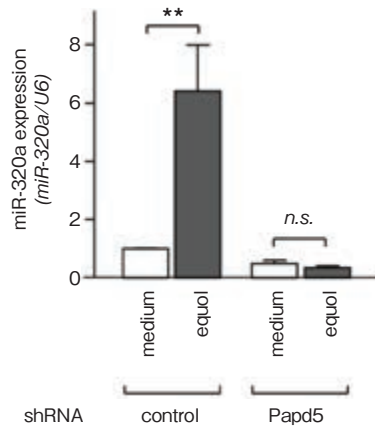


Fig. 4. Equol increased miR-320a expression in the Papd5-dependent manner. The HeLa cells stably-expressing control-shRNA or Papd5-shRNA were treated with 10  $\mu$ M equol for 24 h and then miR-320a expression levels were assessed by real-time quantitative PCR analysis. Data are presented as mean  $\pm$  SD,  $n=3$ . \*\* $p<0.01$ . "n.s." means not significant.

## 要 約

低分子RNAの一種であるマイクロRNAは遺伝子の発現を制御する働きを持ち、様々な生命現象において重要な役割を持つ分子として注目されている。本研究では大豆イソフラボンのマイクロRNA発現調節作用について検討した。ヒト子宮頸がん細胞株HeLaにおいて、マイクロRNAチップを用いた解析により、大豆イソフラボンが発現量を増加させるマイクロRNAとしてmiR-320aを見出した。miR-320aの標的遺伝子であるCTNNB1がコードする $\beta$ -cateninのたん白質発現は大豆イソフラボンにより抑制された。こうした作用には、大豆イソフラボンのエストロゲン受容体非依存的ながん細胞増殖抑制作用に関わる遺伝子であるPapd5が関与することが示された。以上より、大豆イソフラボンはPapd5を介してmiR-320a発現を増加させ $\beta$ -catenin発現を抑制する可能性が示された。

## 文 献

- 1) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- 2) Tham DM, Gardner CD and Haskell WL (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical epidemiological and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2223-2235.
- 3) Yamashita S, Tsukamoto S, Kumazoe M, Kim YH, Yamada K and Tachibana H (2012): Isoflavones suppress the expression of the Fc $\epsilon$ RI high-affinity immunoglobulin E receptor independent of the estrogen receptor. *J Agric Food Chem*, **60**, 8379-8385.
- 4) Yellayl S, Naaz A, Szewczycowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7616-7621.
- 5) Polakis P (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**, 1837-1851.
- 6) Hsieh IS, Chang KC, Tsai YT, Ke JY, Lu PJ, Lee KH, Yeh SD, Hong TM and Chen YL (2013): MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Carcinogenesis*, **34**, 530-538.